

Antibakterielle Eigenschaften der Phenothiazine

Eine Behandlungsoption für die Zukunft?

Oliver Hendricks, Sønderborg, J. B. Christensen, Kopenhagen, Jette E. Kristiansen, Sønderborg, Dänemark

Die steigende Inzidenz von Infektionskrankheiten, verursacht durch multiresistente Erreger, ist ein globales Problem, das auch im Norden Europas an Bedeutung gewinnt [1–3]. Ursachen lassen sich in einer ständig wachsende Mobilität und der hiermit verbundenen Einführung geographisch atypischer, multiresistenter Erreger finden. Der übermäßige und unangemessene Verbrauch von Antibiotika/Chemotherapeutika sind ein weiterer wesentlicher Faktor [4–6]. Die Zunahme von Mehrfachresistenzen gegen die derzeit angewendeten Antibiotika erfordert die Entwicklung neuer Behandlungsstrategien.

Chlorpromazin, Thioridazin und weitere Arzneimittel aus der Stoffgruppe der Phenothiazine kommen in der Behandlung psychiatrischer Erkrankungen zur Anwendung. Die klinische Bedeutung der Phenothiazine ergibt sich aus ihren psychotropen und antiemetischen Wirkungen. Phenothiazine besitzen zudem eine ausgeprägte antimikrobielle Aktivität. Untersuchungen des Wirkungsmechanismus sowie Modelle für die klinische Nutzung dieser Substanzen in der Antibiotika-Therapie sind Gegenstand aktueller Forschung im Rahmen des Tätigkeitsfelds der ISAAN (International Society of Antimicrobial Activity of Non-Antibiotics).

Chemother J 2004;13:203-5.

Historischer Rückblick

Eine synoptische Betrachtung perspektiviert die Entwicklung der Anwendungsbereiche der Phenothiazine sowie Paul Ehrlichs Mitwirken an diesem Prozess. 1876 entwickelte *Caro* Methylenblau als Farbstoff in der Textilindustrie [7]. 1883 untersuchte *Bernthsen* die chemische Struktur des Methylenblau und definierte Tiodiphenylamin (= Phenothiazin) als den funktionellen Kern der Substanz [8]. Bereits 1880 beschrieb *Paul Ehrlich* die hervorragenden Eigenschaften des Methylenblau in der bakteriologischen Diagnostik [9]. 1886 entdeckte Paul Ehrlich, dass Methylenblau eine besondere Affinität zu nervalen Strukturen besitzt. 1890 beschrieb er die erfolgreiche Behandlung neuritischer Schmerzen mit Methylenblau, 1891 benutzte er Methylenblau in der Behandlung der Malaria, auch hier beschrieb er erfolgreiche Behandlungsverläufe [Guttman & Ehrlich, 1891]. 1937 entdeckten *Edly et al.* bei Versuchen zur Toxikologie der Phenothiazine an Ratten eine Rotfärbung des Urins bei gleichzeitiger, an-

haltender Sterilität des Urins [10]. Phenothiazin, Leukotonal und Tional wurden als Redoxsystem identifiziert. Die Beobachtung der Sterilität des Urins führte zur Anwendung des Phenothiazins in der Behandlung von Harnwegsinfektionen Ende der 1930er Jahre. Die Entdeckung des Penicillins durch *Fleming* 1928 und die anschließende Entwicklung der „klassischen“ Antibiotika, kamen einer systematischen Analyse der antimikrobiellen Anwendung der Phenothiazine zuvor. Den eigentlichen klinischen Durchbruch erzielte die Stoffgruppe der Phenothiazine somit durch die Entwicklung des Chlorpromazins und die hiermit verbundene erhebliche Verbesserung in der Behandlung der Schizophrenie [11].

In-vitro-Aktivität der Phenothiazine

Seit Mitte der 1970er Jahre sind die antimikrobiellen Eigenschaften der Phenothiazine erneut Gegenstand mikrobiologischer Untersuchungen [12–14].

Kristiansen und Amaral belegten die antibakterielle Aktivität gegen grampositive und gramnegative Erreger sowie eine Vielzahl weiterer Mikroorganismen, unter anderem Plasmodia und Mycobacteria [15–19]. Molnar et al. konnten in ihren Versuchen die Elimination von Resistenzplasmiden durch Phenothiazine demonstrieren [20].

Der klinische Wert der direkten bakterio-statischen Aktivität der Phenothiazine ist ungeklärt, da dieser Effekt primär in Konzentrationen erreicht wird, die weit über den für den menschlichen Organismus atoxischen Plasmakonzentrationen liegen. **Tabelle 1** zeigt MHK-Werte antimikrobiell aktiver Phenothiazine gegen pathogene grampositive Erreger, die diesen Sachverhalt illustrieren.

Eine interessante Eigenschaft der Phenothiazine ist, dass sie eine bestehende bakterielle Resistenz gegenüber klassischen Antibiotika beseitigen können. Dies lässt sich bei Applikation von Dosen beobachten, die zum Teil deutlich unter den in **Tabelle 1** dargestellten MHK-Werten liegen und in klinischen Situationen theoretisch erreichbar sind [15, 16, 21]. Der Einfluss der Phenothiazine auf MHK-Werte resistenter grampositiver Erreger ist Teil des Forschungsgebiets von ISAAN [22]. Die **Tabellen 2 bis 5** zeigen Ergebnisse aus Synergie-Studien unter Anwendung der Agardilutionsmethode und Bestimmung der MHK-Werte nach Kärber [23–25].

Anschriften der Verfasser:

Dr. Oliver Hendricks, The International Research Group of Non-Antibiotics, University of Southern Denmark, Sydvang 1, DK-6400 Sønderborg, E-Mail: hendricks@dadlnet.dk

Associate Professor Dr. med. Jette E. Kristiansen, The International Research Group of Non-Antibiotics, University of Southern Denmark, Sydvang 1, DK-6400 Sønderborg, E-Mail: malthe@dadlnet.dk

Dr. J. B. Christensen, Chemical Laboratory II, University of Copenhagen, Kopenhagen, Dänemark

Tab. 1. MHK für *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *S. aureus* und *S. epidermidis* [mg/l] (Thioridazin (rac): Razemat des Thioridazin, Thioridazin (+): Isomer des Thioridazin, polarisiertes Licht nach rechts drehend, Thioridazin (-): Isomer des Thioridazin, polarisiertes Licht nach links drehend)

Phenothiazin-Derivat	<i>S. pneumoniae</i> (n = 10)	<i>S. pyogenes</i> (n = 13)	<i>E. faecalis</i> (n = 11)	<i>E. faecium</i> (n = 9)	<i>S. aureus</i> (n = 20)	<i>S. epidermidis</i> (n = 4)
Chlorpromazin	8–16	8–32	64–128	64	32–64	16–32
Perchlorperazin	16–32	16–32	32–64	32–64	32–64	32
Thioridazin (+)	4–16	4–16	16	16	16–32	16
Thioridazin (-)	4–16	4–16	16	16	16–32	16
Thioridazin (rac)	4–16	4–16	16	16	16–32	16

Tab. 2. MHK für *S. pyogenes* (n = 3)

MHK Erythromycin	24 mg/l
MHK Thioridazin (-), (+), (rac)	16 mg/l
MHK Erythromycin kombiniert mit 12 mg/l Thioridazin (-)	1 mg/l
MHK Erythromycin kombiniert mit 12 mg/l Thioridazin (+), (rac)	< 8 mg/l

Tab. 3. MHK für *S. epidermidis* (n = 2)

MHK Oxacillin	> 256 mg/l
MHK Thioridazin (-), (+), (rac)	16 mg/l
MHK Oxacillin kombiniert mit 8 mg/l Thioridazin (-), (+), (rac)	1 mg/l

Tab. 4. MHK für *S. aureus*, MRSA (n = 4)

MHK Oxacillin	> 256 mg/l
MHK Thioridazin (rac)	32 mg/l
MHK Oxacillin kombiniert mit 12 mg/l Thioridazin (rac)	1 mg/l

Tab. 5. MHK für *E. faecalis* (n = 4)
Thioridazin (rac): Racemat des Thioridazin

MHK Ampicillin	16 mg/l
MHK Thioridazin (rac)	16 mg/l
MHK Ampicillin kombiniert mit 8 mg/l Thioridazin (rac)	4 mg/l

Diskussion

Die Kombination pharmakokinetischer, chemischer und molekularbiologischer Eigenschaften bedingen das weiterhin bestehende Interesse an den Phenothiazinen.

Welcher Mechanismus dem beschriebenen Resistenz-beseitigenden Effekt der Phenothiazine zugrunde liegt, ist vorerst unklar. Die Möglichkeiten der Molekulargenetik haben das Verständnis der Entstehung und Funktion wesentlicher Resistenzmechanismen entscheidend verbessert. Der Einbau aktiver Effluxpumpen in die bakterielle Zellmembran und Strukturveränderungen von Mem-

branproteinen haben ihre Ursache in der Existenz entsprechender Resistenzgene [26, 27]. Die Ergebnisse aktueller Studien, die den Einfluss der Phenothiazine auf die Aktivität von Effluxpumpen untersuchen, bestärken die Hypothese, dass die beschriebene Resistenz-reversierende Aktivität zumindest teilweise auf einer Inhibition von Effluxpumpen beruht [28].

Als Erklärungsmodell ist diese Erkenntnis ungenügend, da die Aktivität der Phenothiazine auch bei verschiedenen Beta-Lactamen beobachtet werden kann (Tab. 3–5), also bei Resistenzmechanismen, die nicht durch die Wirkungsweise von Effluxpumpen erklärt werden. Klinische Beobachtungen über den Verlust der Funktionalität von Resistenzgenen bei *S. aureus* unterstützten die Hypothese, dass Phenothiazine Einfluss auf den genetischen „backbone“ Beta-Lactam-resistenter grampositiver Erreger haben könnten [29].

Eine Studie zur Untersuchung dieser Hypothese ist in Arbeit. Ein alternativer Erklärungsansatz basiert auf dem Einfluss der Phenothiazine auf Membranproteine, zum Beispiel durch die Veränderung des Membranpotenzials im Sinne einer Membranstabilisierung. Dieses Modell trägt dem Sachverhalt Rechnung, dass funktionell äußerst verschiedene Resistenzmechanismen durch die Phenothiazine beeinflusst werden.

Chemisch handelt es sich bei den derzeit erhältlichen Präparaten in der Regel um das Razemat eines stereoisomeren Wirkstoffs. Für das Thioxanthen Clopenthixol gilt zum Beispiel, dass das cis-Isomer psychotrop aktiv, das trans-Isomer dagegen inaktiv ist [30]. Auch die Isomere des Thioridazins besitzen unterschiedliche psychotrope Aktivität: das rechtsdrehende (+)-Isomer besitzt die stärkere Aktivität [31]. Ungeklärt ist hingegen, ob die – technisch mögliche – Trennung der Isomeren der razemischen Substanz eine Trennung der antimikrobiellen von der psychotropen Ak-

tivität ermöglicht. **Tabelle 1** zeigt, dass Razemat und Isomere des Thioridazins eine gleichermaßen starke antimikrobielle Aktivität besitzen. Stereoselektivität ist aus Sicht des modernen Pharmakodesigns ein interessanter Ansatz für die Synthese wirksamer Antibiotika.

Die **Tabellen 2 bis 5** demonstrieren, dass die Isomere des Thioridazins Resistenz-reversierende Aktivität besitzen. Für verschiedene grampositive Spezies lässt sich sowohl im Agardilutionstest als auch in Mikrodilutionsstudien eine Reduktion der primären MHK gegenüber so verschiedenen Antibiotika wie Erythromycin, Ampicillin und Oxacillin beobachten.

Auch hier liegen die in vitro beobachteten Werte von 2 bis 12 mg/l über der in der psychiatrischen Behandlung in vivo beobachteten Blutplasmakonzentration von 0,1 bis 0,5 mg/l. Die Applikation razemischen Thioridazins in einer therapeutischen Dosis von 0,1 bis 0,3 mg/l wirkt dagegen in vitro auf intrazelluläre *Mycobacterium tuberculosis* und *Staphylococcus aureus* bakterizid [21, 32, 33].

Intrazelluläre Lokalisation ist ein Faktor der Pathogenität bei *Streptococcus pyogenes*, *S. aureus* und *S. epidermidis*. Als ein weiterer wesentlicher Faktor erscheint in diesem Zusammenhang die Beobachtung, dass sich in Makrophagen das Entstehen von Phagosomen/Lysosomen beobachten lässt, die weit aus höhere Konzentrationen der entsprechenden Phenothiazine enthalten als die extrazellulären Flüssigkeiten.

Die Untersuchung der Wirksamkeit der Phenothiazine auf die intrazellulär lokalisierten Bakterien ist ein wesentliches Kriterium für die Bewertung des potenziellen klinischen Nutzens dieser Stoffe als Antibiotika; dies wird Inhalt weiterer Studien sein.

Paul Ehrlich vermutete, dass „ein Teil der Lösung zur Behandlung der Infektionskrankheiten in den Nervenheilanstalten zu finden sei“ [9]. Historisch

betrachtet ist die derzeitige Forschungsaktivität eine Renaissance der Phenothiazine in diesem Sinne.

Literatur

- Berger-Bachi B. Resistance mechanisms of gram positiv bacteria. *Int J Med Microbiol* 2002;292:27–35.
- Elsberg-Zinn C, Frimodt-Møller N. Overvågning af Staphylokokinfektioner i Danmark. *SSI, Epi-nyt* uge 10, 2002.
- Frimodt-Møller N, Monnet DL, Sørensen T. Øget resistens mod makrolidantibiotika. *SSI, Epi-nyt* uge 4, 2001.
- Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci: Molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* 1997;10:781–91.
- Dancer SJ. The problems with cephalosporins. *J Antimicrob Chemother* 2000;48:463–78.
- Heinemann J. How antibiotics cause antibiotic resistance. *Drug Discov Today* 1999;4:72–9.
- Caro H. Deutsches Reichs Patent Nr. 1886, Engl. Pat. 3751 vom 9.10.1877.
- Bernthsen A. Zur Kenntnis des Methylenblau und verwandter Farbstoffe. *Chem Ber* 1883;16:2896–904.
- Ehrlich P. Collected papers of Paul Ehrlich. New York: Pergamon Press, 1950:287–9.
- Über das Methylenblau und seine klinisch-bakterioskopische Verwerthung. In: Himmelweit F, Marquardt M, Dale H (eds.). The collected papers of Paul Ehrlich. London: Pergamon Press, 1956;1:287–9. Reprint from *Z klin Med* 1881;cf:Bibl 15.
- Über die Schlafkrankheit. In: Himmelweit F, Marquardt M, Dale H (eds.). The collected papers of Paul Ehrlich. London: Pergamon Press, 1956;1:310–7.
- Eddy CW, Cox AJ, De Eds F. Studies on phenothiazine II. Continued feedings of phenothiazines. *J Ind Hyg Toxicol* 1937;19:574–8.
- Delay J, Deniker P. Le traitement des psychoses par une méthode neurolytique dérivée de l'hibernothérapie. In: Cossa P. (ed.). *Congrès de Médecins Aliénistes et Neurologistes de France*. Paris: Maison Editeurs Libraires de L'Académie de Médecine, 1952;50:497–502.
- Kristiansen JE. Experiments to illustrate the effect of chlorpromazine on the permeability of the bacterial cell wall. *Acta Pathol Microbiol Immun Scand* 1979;87:317–9.
- Chakrabarty AN, Acharya DP, Neogi D, Dastidar SG. Drug interaction of promethazine and other non-conventional antimicrobial chemotherapeutic agents. *Indian J Med Res* 1989;89:233–7.
- Kristiansen JE. The antimicrobial effect of psychopharmacological agents and their stereoisomeric analogues. *Danish Med Bull* 1990;37:165–82.
- Kristiansen JE. Chlorpromazine: Non-antibiotics with antimicrobial activity-new insight in managing resistance? *Curr Opin Invest Drugs* 1993;2:587–91.
- Kristiansen JE, Amaral L. The potential management of resistant infections with non-antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 1997;40:319–27.
- Molnár J, Béládi I, Földes I. Studies on antituberculous action of some phenothiazine derivatives in vitro. *Zentralbl Bakt Hyg* 1977;239:521–6.
- Hendricks O, Butterworth TS, Kristiansen JE. The in-vitro antimicrobial effect of non-antibiotics and putative inhibitors of efflux pumps on *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents* 2003;22:262–4.
- Kristiansen JE, Vergmann B. The antibacterial effect of selected phenothiazines and thioxanthenes on slow-growing mycobacteria. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [B]* 1986;94:393–8.
- Molnár J, Foldeak S, Nakamura MJ, Rausch H, et al. Antiplasmid activity: loss of bacterial resistance to antibiotics. *APMIS* 1992;30(Suppl):24–31.
- Ordway D, Viveiros M, Leandro C, Arrozo MJ, et al. Intracellular activity of clinical concentrations of phenothiazines including thioridazine against phagocytosed *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents* 2002;20:33–4.
- Bourlioux P, Moreaux JM, Su WJ, Boureau H. In vitro antimicrobial activity of 18 phenothiazine derivatives: structure activity relationship. *APMIS* 1992;30(Suppl):40–3.
- Hendricks O, Molnar A, Butterworth T, Butaye P, et al. In vitro activity of phenothiazine derivatives in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* [current study].
- Ericsson H, Sherris JC. Antibiotic sensitivity testing. Report of an international collaborative study. *APMIS* 1971;(Suppl):217.
- Finney DJ. Statistical methods of biological assay. *Biom Z* 1952 p.524 (23, 56).
- Ryan BM, Dougherty TJ, Beaulieu D, Chuang J, et al. Efflux in bacteria: what do we really know about it? *Expert Opin Investig Drugs* 2001;10:1409–22.
- Goffin C, Ghuysen JM. Multimodular penicillin binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998;62:1079–93.
- Kaatz GW, Mougdal VV, Seo SM, Kristiansen JE. Phenothiazines and thioxanthenes inhibit multidrug efflux pump activity in *Staphylococcus aureus* (SA). 42nd ICAAC, San Diego, California, September 2002:Abstract C1–426.
- Wagenfoort JH, et al. Hospital outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* followed by in vivo change to a *mecA*-negative mutant with loss of epidemicity. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000;19:976–7.
- Petersen PV, Nielsen IM, Pedersen V, Jørgensen A et al. Thioxanthenes. In: Usdin E, Forrest I (eds.). *Psychotherapeutic drugs*. New York: Marcel Dekker, 1977:827–67.
- Svensden CN, Froimowitz M, Hrbek C, Campbell A, et al. Receptor affinity, neurochemistry and behavioral characteristics of the enantiomers of thioridazine: evidence for different stereoselectivities at D₁ and D₂ receptors in rat brain. *Neuropharmacology* 1988;27:1117–24.
- Ordway D, et al. Clinical concentrations of thioridazine kill intracellular multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:917–22.
- Ordway D, et al. Chlorpromazine has intracellular killing activity against phagocytosed *Staphylococcus aureus* at clinical concentrations. *J Infect Chemother* 2002;8:227–31.

Die PEG im Internet

<http://www.p-e-g.org/>

Resistenzdaten PEG – Neues aus den Arbeitsgemeinschaften –
Neueste Forschungsergebnisse

Das Chemotherapie Journal im Internet

<http://www.wissenschaftliche-verlagsgesellschaft.de/CTJ>